PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

IGES EIGENTUM
OF DEM VERTRAG ÜBER I

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/00, A01K 67/027, C07K 14/47, C12N 9/10

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/49802

A1

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

31. Dezember 1997 (31.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/01254

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. Juni 1997 (19.06.97)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 25 049.8

22. Juni 1996 (22.06.96)

DE Veru

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BECKER, Klaus [DE/DE];
Selkeweg 4, D-06466 Gatersleben (DE). KAINA, Bernd
[DE/DE]; Lettengasse 4, D-69493 Hirschberg (DE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT

FUR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-

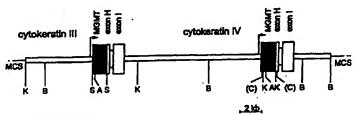
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(54) Title: TRANSGENIC, NON-HUMAN MAMMAL CONTAINING AN ADDITIONAL DNA REPAIR GENE

(54) Bezeichnung: TRANSGENES, NICHT-MENSCHLICHES SÄUGETIER, DAS EIN ZUSÄTZLICHES DNA-REPARATURGEN ENTHÄLT

(57) Abstract

A transgenic, non-human mammal (in particular a mouse) is disclosed, whose body and sexual cells contain an additional DNA repair gene parasexually transmitted to the original animal at the 1-8 cell stage of embryonary development. The invention finds applications in the medical field, in particular the prevention and therapy of malign diseases, and in the pharmaceutical industry. The object of the invention is to provide a transgenic animal suitable for carrying out detailed research on the significance of cellular defence mechanisms and specific DNA-damages during tu-



pCkMGMT (24kb)

A: Ant II, B: BernH I, C: Cta I, K: Kpn I, S: Sai I, MCS: multipler (Contenungsort MULTIPLE CLORING SITE

mour formation. This should give a new impulsion to the prevention and therapy of malign diseases. For this purpose, a transgenic, non-human mammal is provided which contains an additional DNA repair gene coding for a function suitable for eliminating alkylated DNA lesions, the coded function being an O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), or for a function that corrects UV-induced damages. In a specially preferred embodiment of the invention, an additional recombinant repair gene is inserted which is expressed in the epidermis of the claimed mammal.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parasexuellem Wege im 1- bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden. Dieses Ziel wird gemäß der Erfindung mit einem transgenen, nicht-menschlichen Säugetier erreicht, welches ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält, welches eine Funktion kodiert, die der Entfermung von alkylierten DNA-Läsionen dient, wobei die kodierte Funktion eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist, oder die eine Korrektur von UV-induzierten Schäden bewerkstelligt. Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Leantho	81	Slowenien
AM	Armenien	PI	Finnland	LT	Litagen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN:	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LY	Lettland	SZ	Swaailand
AZ	Ascrbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Techad
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar		Togo
BB	Belgien	GN	Quinea	MK	Die chemalige jugoslawische	TJ	Tedschikisten
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	MIN.		TM	Turkmenistan
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Republik Mazedonien Mali	TR	Türkei
BJ	Benin	IE	Irland	MN		TT	Trinidad und Tobago
BR	Brasilien	IL	Israel		Mongolei	UA	Ukraine
BY	Belanu	LS	Island	MR	Manrotanion	UG	Uganda
CA	Kanada	IT	Italien	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
Ğ₹	Zentralafrikanische Republik	JP		MX	Mexiko		Amerika
œ	Kongo	•-	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
СН	Schweiz	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CI		KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CM	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tachechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	u	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dinemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 97/49802 PCT/DE97/01254 -

Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, das ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthält

Beschreibung

5

Die Erfindung beschreibt ein transgenes, nicht-menschliches Säugetier (speziell eine Maus), dessen Körper- und Geschlechtszellen ein zusätzliches DNA-Reparaturgen enthalten, das dem Ursprungstier auf parasexuellem Wege im 1-bis 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung übertragen wurde.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, insbesondere die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen, und die pharmazeutische Industrie.

15

20

25

35

...... 10

Transgene Tiere stellen für die biomedizinische Forschung sehr wertvolle Modelle dar, mit denen es gelingt, durch das Hinzufügen, Verstärken oder den experimentell erzeugten Ausfall von Genfunktionen die Rolle bestimmter zelleigener Faktoren bei ortho- oder pathogenetischen Prozessen in vivo, also im Gesamtorganismus aufzuklären. Insbesondere in der Krebs-forschung bieten transgene Tiermodelle die Möglichkeit, in Cancerogenese-Mechanismen experimentell einzugreifen. Die Krebsentstehung ist ein Mehrstufen-Prozeß, der mit der Initiation beginnt und sich über mehrere Stadien der Tumorpromotion und malignen Progression fortsetzt, bis ein klinisch diagnostizierbares Carcinom entstanden ist. Diesem Gesamtprozeß liegen verschiedene genetische und epigenetische Ereignisse zugrunde, die entweder spontan erfolgen oder durch chemische und physikalische Noxen induziert werden können; in jedem Falle handelt es sich um einen außerordentlich langwierigen Prozeß. Durch transgene Tiermodelle ist man in der Lage, bestimmte Ereignisse, die zur Generierung einer Krebserkrankung notwendig sind, experimentell zu verstärken bereits mit Eigenschaften transgenen Tiere bzw. die die sie entweder tumorresistenter auszustatten, tumoranfälliger machen, wobei sich in wesentlich kürzeren

Zeiträumen Neoplasmen entwickeln können. Derartige Modelle (z.B. US-Patent 4 736 866 der Harvard-Universität Transgenic non-human mammals") können eingesetzt werden, um carcinogen-verdächtige Substanzen (z.B. Arzneimittel) auf ihre krebsauslösende Wirkung zu untersuchen bzw. bestimmte Substanzklassen auf ihre eventullen antineoplastischen Effekte zu untersuchen.

Es gibt bereits Tiermodelle, die zusätzlich Reparaturgene enthalten (S. Gerson et al., Mutat. Res. 307: 541-555, 1994). Die Reparaturgene dieser Modelle wirken jeweils nur in bestimmten Organen (Leber bzw. Thymus) und sind damit nur bedingt in der Lage, die einzelnen Schritte der Cancerogenese (Initiation, Promotion, Progression) einer experimentellen Analyse zugänglich zu machen.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein transgenes Tier zur Verfügung zu stellen, welches geeignet ist, detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung zellulärer Schutzmechanismen und spezifischer DNA-Schäden im Prozeß der Tumorentstehung durchzuführen. Damit sollen neue Impulse für die Prophylaxe und die Therapie maligner Erkrankungen ermöglicht werden.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mit einem transgenen Tier gemäß den Ansprüchen 1 - 16 erreicht. Dieses Tier wird bevorzugt folgendermaßen erhalten:

Die Übertragung des Transgenes erfolgt vornehmlich im Stadium der Zygote, so daß das Transgen, nachdem es in das Ergut (Genom) des sich entwickelnden Organismus integriert wurde, in allen seinen somatischen und generativen Zellen gleichermaßen vorhanden ist. Das Vorhandensein des Transgenes in den Keimzellen des auf diesem Wege hergestellten transgenen Tieres hat zur Folge, daß auch die Nachkommen dieses Tieres das zusätzliche Gen im Genom aller ihrer Zellen enthalten.

Das für die Genübertragung verwendete DNA-Reparaturgen codiert ein Protein, das in der Lage ist, spezifische DNA-Primärschäden, die durch chemische oder physikalische Substanzen oder endogen in der Erbsubstanz hervorgerufen werden, effizient zu entfernen und somit die der Erbsubstanz wieder herzustellen. die nicht oder falsch repariert werden, Primärläsionen. können zu Mutationen führen, die wiederum Erbkrankheiten hervorrufen oder die Ursache für die Entstehung von Tumoren sein können. Somit wird durch die Übertragung und Expression zusätzlichen DNA-Reparaturgenes die Kapazität betreffenden gentechnisch veränderten Säugetieres zur DNA-Schadenskorrektur erhöht und seine Tumor-Suszeptibilität verringert.

15

20

30

10

Die beanspruchten Tiere sind geeignete Modelle, die Bedeutung bestimmter DNA-Reparaturproteine als zelluläre Schutzmechanismen gegenüber der tumorinduzierenden Wirkung von exogenen und endogenen Noxen zu bestimmen. Eine signifikante Reduktion von Mutationen bzw. Tumoren in den beschriebenen transgenen Tieren Behandlung nach mit mutagenen cancerogenen Substanzen ist der entscheidende Beweis dafür, daß es sich bei dem in diesem Tier exprimierten transgenen DNA-Reparaturprotein um einen entscheidenden protektiven Faktor des Säugers zur Verhinderung von Erbgutschäden bzw. Krebs handelt.

Da bestimmte DNA-Reparaturproteine zumeist nur ganz spezifische DNA-Primärschäden erkennen und reparieren, lassen sich aus der verminderten Mutations-/Tumorinzidenz ebenfalls wichtige Rückschlüsse auf die zur Mutations-/Tumorauslösung entscheidenden DNA-Primärschäden ziehen.

Eine besonders bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht 35 darin, ein zusätzliches rekombinantes Reparaturgen einzufügen, das in der Epidermis des beanspruchten Säugetiers exprimiert wird. Durch das Expressions-Targeting der

4

genannten DNA-Reparaturgene in der Haut der beanspruchten Tiere kann man durch die Anwendung des Mehrphasen-Hautcarcinogenese-Modells die Bedeutung bestimmter Typen von chemisch oder physikalisch induzierten DNA-Primärschäden und von zellulären Schutzfunktionen während der Tumorinitiation, Tumorkonversion und -promotion sowie der malignen Progression feststellen.

Diese Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für die 10 Ableitung möglicher präventiver und therapeutischer Maßnahmen bei verschiedenen Krebserkrankungen des Menschen.

Säugetiere beschriebenen transgenen Kreuzen der Das (vornehmlich Mäuse), die ein zusätzliches DNA-Reparaturgen exprimieren, mit anderen transgenen Säugetieren (vornehmlich Mäuse), die z.B. bestimmte Markergene als Mutationstarget enthalten und als in vivo-Mutationsdetektions-Modelle für die Genotoxizitätsprüfung in der chemischen und pharmazeutischen Aussagen darüber Industrie verwendet werden, läßt inwieweit ein solcher artifizieller Mutationsmarker im Genom eines Säugetieres der Prozessierung von DNA-Schäden durch die Zelle zugänglich und damit der Mutabilität des Säugergenoms vergleichbar ist.

Damit läßt sich das beanspruchte transgene Modell, bei dem 25 die Expression eines zusätzlichen DNA-Reparaturgenes gezielt in bestimmten Geweben, beispielsweise der Haut, erfolgt, Abschätzung der Bedeutung exzellent einsetzen zur die DNA-Primärschäden für Entstehung spezifischer bestimmten Tumortypen, die durch verschiedene chemische oder 30 physikalische Noxen, beispielsweise UV-Strahlung, induziert werden können. Darüber hinaus erlaubt dieses beanspruchte transgene Modell, die Rolle von Proteinen, die in die Reparatur von DNA-Primärschäden involviert sind, bei der Entartungsprozessen 35 Prävention maliqnen zu von charakterisieren.

.....10

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden

1. Herstellung des rekombinanten Transgenkonstruktes pCkMGMT 5 (Abb. 1):

hautspezifische Expressionsvektor pCkMGMT Der wurde konstruiert durch das Einklonieren der cDNA-Sequenz des menschlichen O Methylguanin-DNA-Methyltransferase Gens, die als 835 bp langes EcoRI-Fragment aus dem Vektor pKT 100 (Tano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 686-690, 1990) isoliert wurde, in das 22kb CkIII/IV*-Minilocus-Plasmid Teratogenesis, Carcinogenesis, al., (Blessing et Mutagenesis, 15: 11-21, 1993), das den bovinen Cytokeratin III- und Cytokeratin IV-Promoter sowie die entsprechenden Polyadenylierungssequenzen enthält. Mit Hilfe geigneter Adapter wurde jeweils eine MGMT-cDNA-Kopie in den unikalen Sall-Ort hinter den CkIII-Promoter und in den unikalen ClaIden CkIV-Promoter eingefügt. hinter Ort angewandten gentechnischen Methoden sind beschrieben bei Maniatis et al., Molecular Cloning, a Laboratory manual", 1989.

2. Herstellung der transgenen Mauslinie, die das rekombinante CkMGMT-Reparaturgen enthält:

Das 22 kb Sfil-Fragment des Expressionsvektors pCkMGMT, das die menschliche MGMT-cDNA jeweils unter der Kontrolle des CkIII und des CkIV-Promoters enthält, wurde elektrophoretisch separiert von der prokaryotischen Vektorsequenz, aus dem Gel USA) gereinigt und zur über QIAex (Quiagen, eluiert, zentrifugiert. QIAex-Partikeln Das Abtrennung von aufgereinigte Fragment wurde in einer Konzentration von 2.5 μ g/ml TE in den leichter zugänglichen der beiden Pronuklei der Zygote mikroinjiziert. Die Isolation der Zygoten, die Mikroinjektion und der Retransfer der manipulierten Zygoten in den Eileiter von Ammenmüttern wurden entsprechend den in Hogan et al., (Manipulatig the Mouse Embryo, A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1994) beschriebenen Methoden durchgeführt.

5 3. Identifizierung der CkMGMT-transgenen Tiere:

Im Alter von 4-6 Wochen wurde den aus der Mikroinjektion hervorgegangenen Tieren ein Stück der Schwanzspitze entnommen und aus diesem Bioptat hochmolekulare DNA nach der bei Hogan 10 et al. (s. oben) beschriebenen Methode isoliert. Jeweils 1 μg der hochmolekularen Maus-DNA wurde verwendet, um mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR) das Transgen im Genom der Tiere nachzuweisen. Der verwendete 5'-Primer bindet an den Positionen -142 bis -117 des Cytokeratin III-Promoters, der 3'-Primer bindet an der 15 menschlichen MGMT-cDNA (Positionen +727 bis +748), wodurch ein 890 bp Fragment amplifiziert wurde, das nach elektrophoretischer Separation per Southern Blot-Analyse detektiert wurde. Die Transgen-Integration in das Mausgenom wurde duch genomische Southern Blot-Analysen 20 Verwendung von 25µg DNA, die zuvor Restriktionsendonukleasen Bam HI, Sal I, Cla I, Kpn I und Aat II gespalten wurde, verifiziert. Als radioaktiv markierte DNA-Sonde diente in beiden Fällen das 835 bp Eco RI-Fragment der MGMTcDNA.

25

Die transgenen Tiere wurden mit nicht-transgenen Mäusen des gleichen Stammes verpaart und die Transmission des Transgenes mit den für die Identifizierung der Founder-Tiere beschriebenen Techniken geprüft. Die positiven G1-Nachkommen wurden untereinander verpaart und die homozygoten Tiere mittels quantitativer Phosphor- Imaging- Analyse selektiert.

4. Charakterisierung der transgenen Mauslinie:

Zum Nachweis der gewebespezifischen Expression des Transgenes wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen und Geweben der transgenen Tiere nach der Guanidiniumthiocyanat/Phenol. _ 10

15

20

25

30

Methode (Chomczynski et al, Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987) extrahiert und mittels Oligo-dT-Cellulose aufgereinigt. Die so erhaltene Poly(A) +-RNA wurde in einem denaturierenden Bedingungen unter Agarosegel separiert. Das Transgen spezifische elektrophoretisch Transkript wurde durch Northern Blot-Analyse mittels einer 835 bp Probe der menschlichen MGMTcDNA nachgewiesen. Die menschlichen funktionsfähigen Existenz des Reparaturproteins wurde wie folgt geprüft. Gewebeproben der transgenen Tiere wurden in Extraktionspuffer (20mM Tris-Cl, pH 8,5, 1mM EDTA, 1mM B-Mercaptoethanol, 10mg/ml Aprotinin, 10mM Bestatin, 10mM Leupeptin, 0,1mM PMSF) homogenisiert, einer Ultraschallbehandlung unterzogen und anschließend zentrifugiert. Jeweils 40 µg der aus den Zellextrakten isolierten Proteine wurden in einem 12,5%igen Polyacryamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Hilfe polyklonaler Kaninchen-Antikörper, die spezifisch die menschliche MGMT erkennen, detektiert. Zur Lokalisierung des transgenen MGMT-Proteins in den basalen und suprabasalen Epidermiszellen und den Zellen der Haarfollikel wurden immunohistochemische Nachweistechniken unter Verwendung der Die Aktivität Antikörper benutzt. obengenannten transgenen Reparaturproteins in den epidermalen Zellen wurde durch den Transfer H-markierter Methylgruppen von der 06-³H-MNU-behandelter Kalbsthymus DNA Position des Guanins quantitativ bestimmt (Preuss et al., Int. J. Cancer, 61: 321-326, 1995).

Die transgene Mauslinie CkMGMT-Tg3 exprimierte das in ihr Genom integrierte rekombinante DNA-Reparaturgen gewebespezifisch in der Haut, wobei das menschliche MGMT-Protein sich als biologisch aktiv erwies und in der interfollikulären Epidermis und den äußeren Zellen der Haarfollikel nachweisbar war.

5. Carcinogenese-Untersuchungen:

- Zweiphasen-Hautcarcinogenese-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die Expression des zusätzlichen rekombinanten DNA-Reparaturgenes in der Epidermis beschriebenen transgenen Tiere die Suszeptibilität dieser gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung Substanzgruppen signifikant verringert. Im einzelnen wurde die Tumorinitiation durch eine einmalige dermale sub-_____10 __ threshold '-Dosis N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU), methylierenden N-Nitrosoverbindung, herbeigeführt. 1 Woche nach der Initiation wurde die Tumorpromotion durchgeführt, indem zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen der Phorbolester TPA topikal appliziert wurde. Im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren des gleichen Stammes war die Hauttumorinzidenz bei den beschriebenen CkMGMT-transgenen Mäusen drastisch reduziert (Abb. 2). Wurde den CkMGMTtransgenen Tieren jedoch 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA), das andere cancerogene DNA-Schäden als O'-Alkylguanin 20 induziert, als Initiator verabreicht und nachfolgend TPA topikal appliziert, so war die Häufigkeit von Hauttumoren bei beiden Gruppen von Tieren gleich. Dies zeigt, daß
 - das O⁶-Methylguanin die wichtigste präcarcinogene DNA-Primärläsion bei der MNU-induzierten Hautcarcinogenese darstellt,
 - das MGMT-Reparaturprotein den entscheidenden protektiven Mechanismus der Zelle zur Prävention von Mutationen, die durch Alkylantien induziert werden und Ursprung für die Entstehung von Tumoren sein können, darstellt,
 - eine gewebespezifische Erhöhung des MGMT-Gehaltes, wie durch die hautspezifische Expression des zusätzlichen rekombinanten MGMT-Reparaturproteins in transgenen Mäusen gezeigt wurde, der Zelle einen effizienten Schutz gegenüber der tumorbildenden Wirkung alkylierender Substanzen verleiht,
 - 35 die Schutzfunktion auf der schadensspezifischen Reparatur von präcarcinogenen DNA-Läsionen beruht,

 die protektive Wirkung des MGMT-Proteines gegenüber der hautcarcinogenen Wirkung von Alkylantien auf der Prävention der Tumorinitiation beruht und nicht durch eine Beeinflussung von Mechanismen der Tumorpromotion oder durch eine generelle
 Beeinträchtigung der Tumorsuszeptibiliät zustande gekommen ist.

PCT/DE97/01254

WO 97/49802

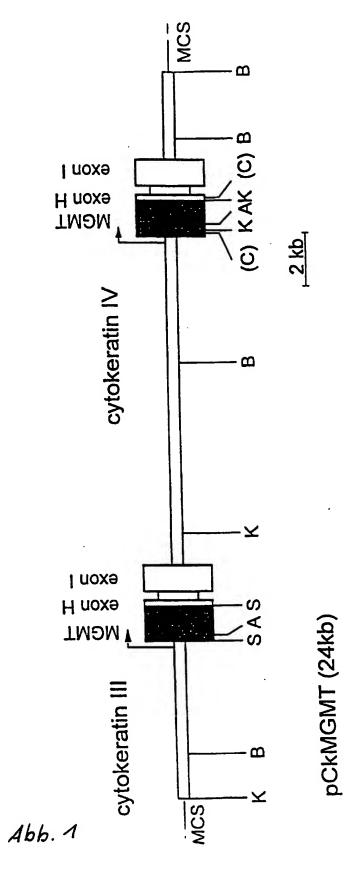
35

10

Patentansprüche

- 1. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, dessen somatische und Keimzellen ein zusätzliches rekombinantes DNA-Reparaturgen enthalten, das dem genannten Säugetier oder seinen Vorfahren auf parasexuellem Wege im frühen embryonalen Stadium übertragen wurde.
- 2. Säugetier gemäß Anspruch 1, das ein rekombinantes DNAReparaturgen in seinem Genom an einem anderen chromosomalen
 Ort als die ebenfalls im Genom des genannten Säugetieres
 vorhandene endogene, zum genannten DNA-Reparaturgen homologe
 DNA- Sequenz integriert hat.
 - 15 3. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die der Entfernung von alkylierten DNA-Läsionen dient.
 - 4. Säugetier gemäß Anspruch 3, dessen transgenes DNA20 Reparaturgen eine O⁶-Methylguanin- DNA-Methyltransferase
 (MGMT) kodiert.
 - 5. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen eine Funktion kodiert, die die Korrektur von UVinduzierten DNA-Schäden bewerkstelligt.
 - 6. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Säugetier stammt.
 - 30 7. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Nicht-Säuger stammt.
 - 8. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen von einem Bakterium stammt.
 - 9. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen transgenes DNA-Reparaturgen synthetisiert worden ist.

- 10. Säugetier gemäß Anspruch 1, dessen genanntes rekombinantes DNA-Reparaturgen unter der transkriptionellen Kontrolle eines vom endogenen Promoter verschiedenen Regulatorelementes steht.
- 11. Säugetier gemäß Anspruch 10, dessen genanntes rekombinantes DNA- Reparaturgen von einem gewebespezifisch regulierten Promoter kontrolliert wird.
- 12. Säugetier gemäß Anspruch 10, wobei der genannte Promoter induzierbar ist.
- 13. Säugetier gemäß Anspruch 11, wobei der genannte Promoter 15 ein Kontrollelement der Keratingenfamilie ist.
 - 14. Säugetier gemäß Anspruch 11, dessen rekombinantes DNA-Reparaturgen in der Epidermis des genannten Säugetieres exprimiert wird.
 - 15. Säugetier gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Säugetier ein Nagetier ist.
- 16. Säugetier gemäß Anspruch 15, wobei das genannte 25 Säugetier eine Maus ist.



A: Aat II, B: BamH I, C: Cla I, K: Kpn I, S: Sal I, MCS: multipler Klonlerungsort

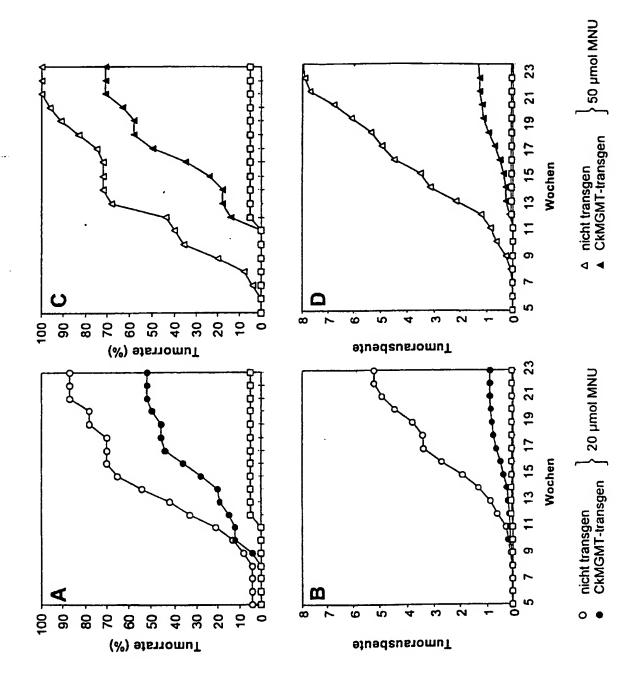


Abb. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr val Application No PCT/DE 97/01254

A 01 400			
IPC 6	SIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/00 A01K67/027 C07K14	1/47 C12N9/10	
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national classi	figation and IPC	
	SEARCHED		
Minimum o IPC 6	documentation searched (classification system followed by classific A91K C97K C12N	ation symbols)	
	ation searched other than minimum documentation to the extent the		
	CONTRACTOR COLUMN STREET, COLUMN COLU	omie zna, wniere przodozi, sezran terms used	
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Chation of document, with Indication, where appropriate, of the r	elevant passages	Relevant to claim No.
0,X	25th Annual Meeting of the Euro Environmental Mutagen Society, Noorwijkerhout, NL, 1823. Juni 1995, XP002043441 see abstract	pean	1-6, 10-16
X	& BECKER, K. ET AL.: "Expressicytokeratin-promoter driven hum repair gene in transgenic mouse MUTATION RESEARCH, vol. 360, no. 3, 1996, pages 272-273, 7-3 see abstract	an MGMT	1-6, 10-16
		-/	
X Furth	ner documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in	наппех.
"A" docume conside "E" earlier of filing de "L" documes which is citations "O" docume other m"P" documes	nt which may throw doubts on priority claim(a) or a cited to establish the publication date of enother a or other special reason (as specified) int referring to an oral disclosure, use, exhibition or	"T" later document published after the inten- or priority date and not in conflict with t- cited to understand the principle or the invention "X" document of particular relevance; the ol- connot be considered novel or cannot t- involve an inventive step when the doc- "Y" document of particular relevance; the ol- connot be considered to involve an inv- document is combined with one or mor ments, such combined with one or mor ments, such combination being obvious in the art. "8." document member of the same patent fa-	he application but ory underlying the aimed invention be considered to urment is taken alone simed invention entive step when the e other such docu- s to a person skilled
	otual completion of the international search	Date of mailing of the international search	
22	2 October 1997	31.10.97	
Name and m	tailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Chambonnet, F	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

, 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No PCT/DE 97/01254

(Continu	itian) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	lo time to the
ategory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
(LIU, L. ET AL.: "Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to O6-benzylguanine using a transgenic model" CANCER RESEARCH., vol. 56, no. 8, 15 April 1996, MD US, pages 1880-1885, XP002043438 see the whole document	1-4,6, 9-11,15, 16
X	GERSON, S.L. ET AL.: "Alkyltransferase transgenic mice: probes of chemical carcinogenesis" MUTATION RESEARCH, vol. 307, no. 2, 1994,	1-8, 10-12, 15,16
	pages 541-555, XP002044222 cited in the application see the whole document	
x	LIU, L. ET AL.: "Rapid repair of O6-methylguanine-DNA adducts protects transgenic mice from N-ethylnitrosurea-induced thymic lymphomas" CANCER RESEARCH., vol. 54, no. 17, 1 September 1994, MD	1-4,6, 9-11,15, 16
	US, pages 4648-4652, XP002043439 see the whole document	
P,X	BECKER, K. ET AL.: "Targeted expression of human 06-methylguanine-DNA transferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis" CANCER RESEARCH., vol. 56, no. 14, 15 July 1996, MD US, pages 3244-3249, XP002043440 see the whole document	1-6, 10-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/DE 97/91254

			•
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGBGEGENSTANDES C12N15/00 A01K67/027 C07K14/	47 C12N9/10	
Nach der In	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla	usification and der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
Recharchie IPK 6	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb A01K C07K C12N	ole)	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Vertiffentlichungen, s	oweit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbarsk (i	Name der Dafenbank und evtl. verwendete 8	Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, zoweit erforderlich unter Anget	ne der in Betracht kommenden Telle	Betr. Anapruch Nr.
0,X	25th Annual Meeting of the Europ Environmental Mutagen Society, Noorwijkerhout, NL, 1823. Juni 1995, XP002043441 siehe Zusammenfassung	ean	1-6, 10-16
X	& BECKER, K. ET AL.: "Expressio cytokeratin-promoter driven huma repair gene in transgenic mouse" MUTATION RESEARCH, Bd. 360, Nr. 3, 1996, Seiten 272-273, 7-3 siehe Zusammenfassung	n MGMT	1-6, 10-16
X West	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	Siehe Anhang Patentfamilie	
entre	shmen		international design
"A" Verüffer aber ni "E" älteres (Anmeli "L" Verüffen sohsin anders	Kabsporien von angegabenen Veröffentlichungen : ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, icht als besonders bedeutsam anzusehen ist. Dokument, das jedoch enst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist ttlichung, die geginet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en inn Recherchenbericht genannten Veröffentlichung beiegt werden en fin der der den der der den der der der den der der der der den der der den der der der der den der	"I" Spatere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeidung richt kollidiert, sondern nur Erfindung zugrundeliegenden Prinzipe Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlichen sinderischer Tätigteit beurhend betre "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu	worden ist und mit der zum Verstindnis des der oder der ihr zugrundelisgenden tung; die beenspruchte Erfindung hung, nicht als nau oder auf obtet werden
ausgef "O" Vertifier eine Be	er om ente ekkelti attoeren nesourausu ortano enfedensi ser (sie	kann nicht als auf erfinderischer Tätiglo werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmenn "& Veröffentlichung, die Mitglied derseiben	eit beruhend betrachtet einer oder mehreren enderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist
	Abechlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Rec	sherchenberiohts
2	2.0ktober 1997	31.10.9/	·
Name und P	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentisan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevolimächtigter Bediensteter Chambonnet, F	

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr value Aktonzeichen
PCT/DE 97/01254

atagorie*	LIU, L. ET AL.: "Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to 06-benzylguanine using a transgenic model" CANCER RESEARCH., Bd. 56, Nr. 8, 15.April 1996, MD US, Seiten 1880-1885, XP002043438	1-4,6, 9-11,15, 16
	of human and mouse alkyltransferase to O6-benzylguanine using a transgenic model CANCER RESEARCH., Bd. 56, Nr. 8, 15.April 1996, MD US, Seiten 1880-1885, XP002043438	9-11,15,
x		
1	siehe das ganze Dokument GERSON, S.L. ET AL.: "Alkyltransferase	1-8,
	transgenic mice: probes of chemical carcinogenesis" MUTATION RESEARCH, Bd. 307, Nr. 2, 1994,	10-12, 15,16
	Seiten 541-555, XP002044222 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	
X	LIU, L. ET AL.: "Rapid repair of 06-methylguanine-DNA adducts protects transgenic mice from N-ethylnitrosurea-induced thymic lymphomas" CANCER RESEARCH., Bd. 54, Nr. 17, 1.September 1994, MD US, Seiten 4648-4652, XP002043439 siehe das ganze Dokument	1-4,6, 9-11,15, 16
P,X	BECKER, K. ET AL.: "Targeted expression of human O6-methylguanine-DNA transferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis" CANCER RESEARCH., Bd. 56, Nr. 14, 15.Juli 1996, MD US, Seiten 3244-3249, XP002043440 siehe das ganze Dokument	1-6, 10-16